



SEAP

Calle Ancora, 3, 2º B
28045 MADRID
Tfno. y Fax 91 539 86 28
MAIL: SEAP@SEAP.ES



Programa de Garantía de
Calidad en Patología

Módulo de IHQ GENERAL

Ronda nº 7

Antígeno probado: Melan-A

Tejido probado: SEAP-GCP - Ganglio Linfático con Metástasis de Melanoma

LOCAL - Mayoritariamente Melanoma primario o metastático

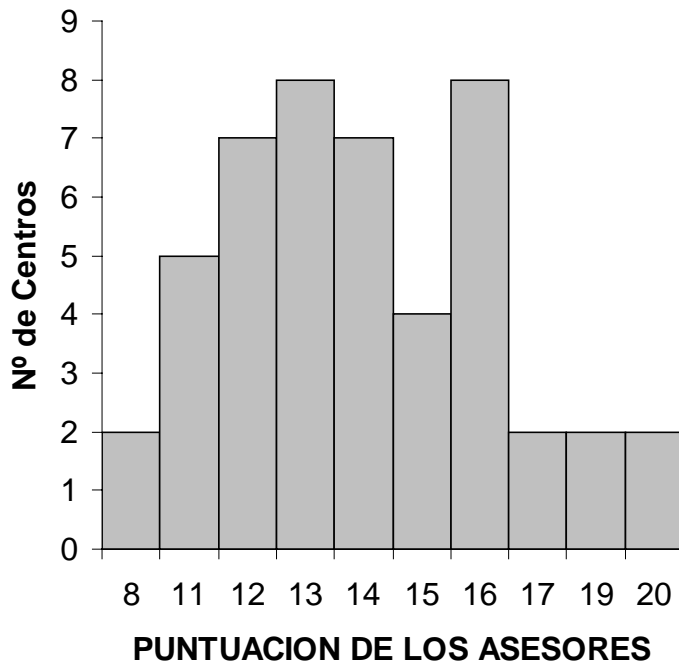
Instrucciones: Los participantes fueron invitados a teñir con Melan-A la preparación remitida por el programa (ganglio linfático con metástasis de melanoma fijada en formol al 10%, pH 7 durante 24 horas) y su propia preparación control, devolviendo ambas preparaciones para su evaluación.

Número de laboratorios participantes:

- Remitidos: 86
- Contestados: 45; 52,3% (control GCP) y 47; 54,65% (Control Local)

Estudio de los controles de cada centro: Los resultados de la evaluación fueron los siguientes:

Melan-A 7ª Ronda Control Local



Considerando que una puntuación superior a 12 se considera aceptable, el 87,11% de las preparaciones remitidas se consideraron como aceptables, con un 29'78% con una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o cercanas. Estos resultados, aunque son positivos, son mejorables. El 55'31% de las preparaciones obtuvieron una puntuación de entre 12 y 15, considerada aceptable, pero no excelentes. La mayoría de los centros participantes ha obtenido un nivel superior al mínimo aceptado para considerar que la técnica puede aplicarse con fines diagnósticos de manera rutinaria, especialmente teniendo en cuenta que su expresión contribuye al diagnóstico y estadiaje de los melanomas. Un total de 39 centros (45,3%) no fueron evaluados: en 31 de ellos (36%) no fue posible la evaluación de las preparaciones debido a que no fueron remitidas y 8 centros (9,3%) carecían del anticuerpo solicitado.

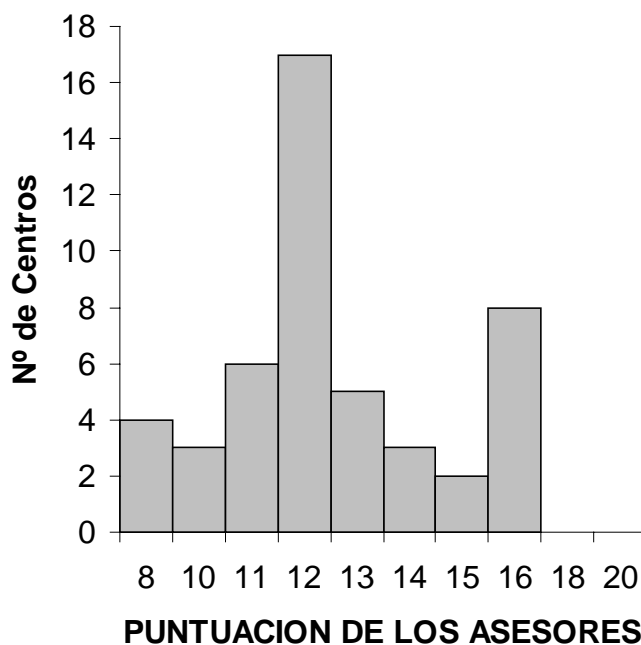
Los principales problemas detectados han sido una alta frecuencia de tinción escasa o débil, que puede provocar un incremento de falsos negativos, y por tanto una baja sensibilidad de la técnica y de los resultados esperados. Éste problema puede inducir a errores en el diagnóstico debido a

una falsa interpretación de la negatividad en algunas células, con consiguiente disminución en el diagnóstico y estadiaje de estos pacientes, así como en la detección de metástasis en ganglios linfáticos, centinela o no centinela. Otro problema detectado con frecuencia fue la presencia de tinción de fondo, mala preservación de tejido o artefacto debido a pretratamiento excesivo con calor. En caso de usar olla a presión, es aconsejable ajustar el tiempo según los resultados que se obtengan.

En los casos con puntuaciones inferiores a 12/20, además, destacaban los artefactos técnicos generales (hidratación, contraste inadecuado por exceso o defecto, defectos en la manipulación con rotura del corte, etc), inadecuada selección del tejidos control, o tinciones irregulares que pueden inducir a errores en el diagnóstico.

Estudio de los controles remitidos por el programa GCP:

Melan-A 7ª Ronda Control GCP



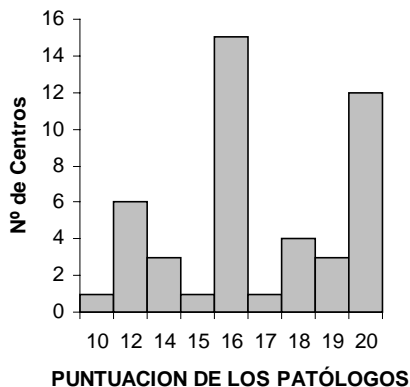
Considerando que una puntuación igual o superior a 12 se considera aceptable, el 77,7% de las preparaciones remitidas se consideraron aceptables. Únicamente un 17,7% obtuvieron una puntuación igual a 16/20, considerada como óptima o cercana. Los principales problemas detectados han sido por una parte una alta frecuencia de una tinción insuficiente o ligera, una discreta tinción de fondo o la presencia de degradación del tejido por exceso de pretratamiento; problemas fácilmente solventables con ajustes en la concentración y/o tiempos de incubación del anticuerpo

primario, así como menor tiempo de pretratamiento con calor. En los casos de puntuación inferior a 12/20, los principales problemas eran una tinción prácticamente inexistente o muy débil en intensidad o en número de células, inferior al esperado, lo que puede inducir a diagnosticar falsos negativos, así como tinciones irregulares o inespecíficas, que pueden inducir a errores diagnósticos. En los controles ofrecidos (GCP), prácticamente no se observaron problemas de artefactos técnicos generales (hidratación, contraste inadecuado por exceso o defecto, defectos en la manipulación con rotura del corte, etc). El contraste con los resultados de los controles locales, pone, una vez más, de manifiesto la influencia del procesamiento previo del tejido control utilizado, que es el factor diferente en ambos casos y probablemente responsable de las discrepancias.

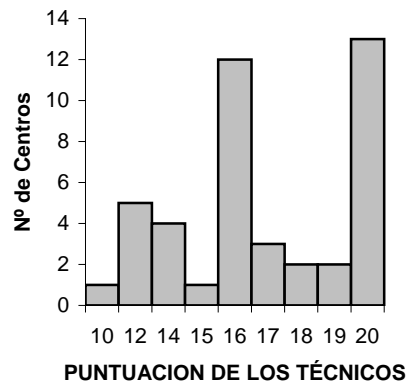
Resultados de la autoevaluación: Como se indica en las instrucciones remitidas, la autoevaluación es una parte importante del programa de Garantía de Calidad. El 89,3% de los técnicos y el 93,6% de los patólogos participantes remitieron su valoración de los controles locales y el 91,48% y el 95,74% respectivamente del control del GCP. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Control Local

Melan-A 7ª Ronda Control Local



Melan-A 7ª Ronda Control Local

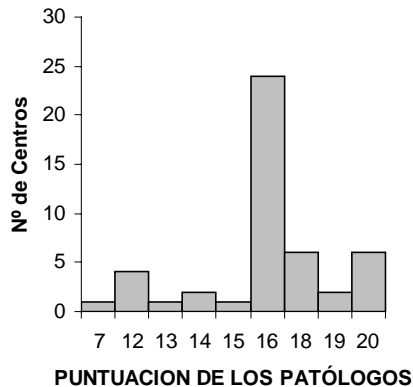


Como se puede observar en los gráficos, la percepción local sobre los resultados de la técnica es superior a la valoración de los observadores externos. Para los técnicos participantes el 68,08% de los casos tenían una puntuación igual o superior a 16/20. Este porcentaje era del 74,46% en el caso de los patólogos. En ambos casos esas cifras casi triplican las de los observadores externos. La tendencia generalizada a sobrevalorar los resultados de la técnica, se corrige al observar detalladamente y de manera

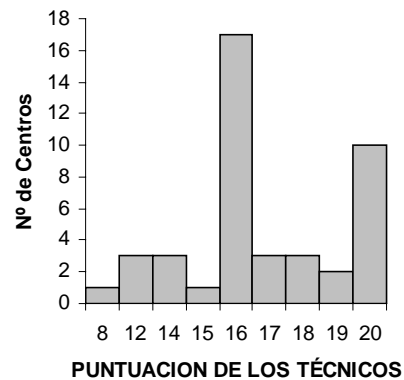
objetiva la tinción y la intensidad de la misma, así como puntuar detalles como la presencia de fondo, la degradación del tejido por pretratamiento excesivo, la uniformidad de tinción en el conjunto de la preparación o la tinción inespecífica no deseada.

Control del GCP

Melan-A 7ª Ronda Control GCP



Melan-A 7ª Ronda Control GCP



Los resultados son similares al control local, con un 77,77% de preparaciones con una puntuación igual o superior a 16/20 para los técnicos, y un 84,44% para los patólogos, Sigue observándose una discrepancia con las valoraciones de los asesores externos (17,7% frente a 84,44%), que cuadriplica el valor. Estas diferencias pueden deberse a la uniformidad de fijación y de condiciones técnicas de los controles GCP

Inmunotinción óptima: Se consideró una inmunotinción óptima la que mostraba teñidos el número de células esperado (ausencia o tinción debil de histiocitos o de fondo) con una adecuada relación en la intensidad de la tinción con respecto al contraste empleado y con mínimo o ausente artefacto tanto de técnica inmunohistoquímica (degradación del tejido por sobrecalentamiento, tinción de fondo, p. ej.) como de técnica histológica (contraste adecuado, ausencia de hidratación, etc). En relación al contraste, y especialmente en aquellos melanomas con gran cantidad de pigmento melánico, se recomienda utilizar contratinción con giemsa en lugar de con hematoxilina. De ésta manera se distinguen las células tumorales, que adquieren un pigmento marrón del cromógeno DAB de la inmunohistoquímica, que contrasta intensamente con el color verdoso de los histiocitos que han fagocitado melanina. Una buena técnica, utilizada por varios laboratorios es el uso de Fosfatasa Alcalina o Fast Red que dan un pigmento rosado o rojizo en lugar de marron. El problema del uso de Fosfatasa Alcalina como

cromógeno en lugar de DAB, es que puede difundir y dar tinción de fondo o inespecífica de algunas células. En casos en que la morfología de las células neoplásicas del melanoma sea clara no presenta problemas, pero en aquellos casos en que el melanoma simula otro tipo de celular, puede plantear problemas.

Los criterios generales de puntuación empleados son los reflejados en las hojas de resultados individuales remitidas.

Mejor método (puntuación de 20/20 en las preparaciones del GCP o Locales):

Método: Dako Tech Mate / Envision, Streptavidina marcada

Bloqueo: Agua oxigenada 3%

Automatización: Biotech Tech Mate 500 / Dako Autostainer; Bond Max Menarini

Digestión enzimática: La mayoría de los centros no realizan recuperación enzimática.

Recuperación antigénica con calor: La mayoría de centros usan olla a presión con tampón citrato pH 6 durante 2 minutos a máxima presión.

Tampón y pH: citrato pH6; pH 7,6;

Anticuerpo primario: Dako M7196 Clon A103, a diluciones entre 1/25 y 1/50, con incubación de entre 15 y 30 minutos a temperatura ambiente.

Cromógeno: DAB Menarini DS 9713; Dako DAB K5001 al 2%1:50; K5007 o K4065, durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. Fosfatasa Alcalina Dako K5005 al 1% durante 7 minutos a temperatura ambiente. Fast Red BioGenex durante 5 minutos.

Comentarios: Con este antígeno no se observa una gran discrepancia en los resultados según se analicen en los controles locales o en el control del GCP. Eliminando el factor "tejido", y atendiendo solo a los resultados del GCP la mayoría de los resultados son adecuados para su utilización rutinaria. Sin embargo hay un porcentaje apreciable con deficiencias técnicas, que podrían inducir a errores de interpretación en casos de tinciones irregulares o en casos con tinciones insuficientes. También se ha observado la presencia de escaso contraste con Hematoxilina en centros en los que se han utilizado nuevos sistemas de detección con determinados teñidores automáticos de reciente implantación. Observación, por otra parte muy solventable aumentando el tiempo de tinción con hematoxilina. La mayoría de centros en los que se ha detectado degradación del tejido por excesivo pretratamiento con calor, que en ocasiones iba acompañado de fondo, se

observó la utilización de olla a presión durante un tiempo superior a 2 minutos.

En general las tinciones de la mayoría de los centros son óptimas y aplicables al diagnóstico de lesiones neoplásicas u otras patologías de forma rutinaria.

En alguna ocasión, el control local seleccionado no fue el adecuado para el antígeno a probar, por no presentar positividad intrínseca (nevus melanocítico o lesiones lentiginosas), o se seleccionaron controles correspondientes a arrays tisulares, que en ocasiones resultaron con patrones de tinción muy irregulares, probablemente influenciados por las diferencias en las condiciones de fijación y tratamiento previo de los distintos tejidos representados.

Se recomienda emplear como control tejido fijado en condiciones conocidas y controladas. Asimismo, en casos con gran cantidad de pigmento melánico que pueda interferir en la interpretación de la positividad de la tinción inmunohistoquímica, se recomienda utilizar como cromógeno la Fosfatasa Alcalina o el Fast Red, en caso de disponer del mismo. En caso contrario, es muy recomendable utilizar Giemsa, en lugar de hematoxilina como contraste (contratinción), ya que permite discernir con claridad las células positivas teñidas de marrón con DAB de los melanófagos, que adquieren un color verdoso con el Giemsa.